

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. med. H.P. Koepchen

---

**KALIUMBINDUNG UND  $^{42}\text{K}^{+}$ -AUSTAUSCHKINETIK  
AM ADVENTITIELLEN BINDEGEWEBE  
DER ARTERIA CAROTIS DES HUNDES**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Wolfgang Rettig**  
aus Much

1982

1983



Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin  
Direktor: Prof. Dr. med. H.P. Koepchen

---

**KALIUMBINDUNG UND  $^{42}\text{K}^+$ -AUSTAUSCHKINETIK  
AM ADVENTITIELLEN BINDEGEWEBE  
DER ARTERIA CAROTIS DES HUNDES**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Wolfgang Rettig**

aus Much

1982

Referent: Prof. Dr. med. G. Siegel

Korreferent: Prof. Dr. med. Th. Günther

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche  
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 4. August 1983

Druck: **Zentrale Universitäts-Druckerei**, Kolchstr. 31, 1000 Berlin 41

Für meine Eltern

Für Emma



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546605\\_0070](https://archive.org/details/IA41546605_0070)

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| ZUSAMMENFASSUNG                                              | 7  |
| EINLEITUNG                                                   | 7  |
| METHODIK                                                     | 8  |
| <i>Präparate und Lösungen</i>                                | 8  |
| <i>Bestimmung der Ionenkonzentrationen</i>                   | 9  |
| $^{42}\text{K}^+$ -Fluxmessungen                             | 9  |
| ERGEBNISSE                                                   | 11 |
| <i>Wasser- und Ionengehalte</i>                              | 11 |
| $^{42}\text{K}^+$ -Influxexperimente                         | 11 |
| $^{42}\text{K}^+$ -Effluxexperimente                         | 12 |
| Kompartiment-Analyse                                         | 12 |
| Bulk diffusion und Adsorption                                | 14 |
| <i>Reaktionskinetisches Modell</i>                           | 16 |
| <i>Affinitätskonstanten</i>                                  | 18 |
| DISKUSSION                                                   | 18 |
| <i>Morphologie und Heterogenität vaskulären Bindegewebes</i> | 18 |
| <i>Titrationsskurve</i>                                      | 20 |
| <i>Kationenbindung am Bindegewebe</i>                        | 20 |
| <i>Spezifische Sites am Adventitia-Bindegewebe</i>           | 22 |
| <i>Strukturelle Kationenbindung</i>                          | 23 |
| <i>Effektive Site-Konzentration am Bindegewebe</i>           | 24 |
| APPENDIX                                                     | 25 |
| LITERATUR                                                    | 26 |
| TABELLEN                                                     | 33 |
| ABBILDUNGEN                                                  | 38 |



## ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die  $^{42}\text{K}^+$ -Austauschkinetik am isolierten adventitiellen Bindegewebe der *A. carotis* des Hundes in  $\text{K}^+$ -Lösungen (0,469; 4,69; 46,9 mM) läßt sich durch ein 3-Kompartiment-Modell oder durch bulk diffusion mit gleichzeitigen chemischen Bindungsreaktionen 1. Ordnung beschreiben.
- 2) Durch die Effluxkinetik lassen sich zwei Klassen spezifischer Bindungsstellen mit hoher Affinität für  $\text{K}^+$  definieren.
- 3) Ein reaktionskinetisches Modell erlaubt die Berechnung intrinsischer Affinitätskonstanten für die  $\text{K}^+$ -Bindung an den Sites ( $K_A \geq 250$  bzw.  $1000 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1}$ ).
- 4)  $\text{K}^+$ -Austauschfraktion und Konzentration austauschender spezifischer Sites am Bindegewebe sind stark von der Ionenstärke der Badlösung abhängig. Daher wird die Bestimmung der effektiven Site-Konzentration aus der Austauschkinetik vorgeschlagen.
- 5) Die Rolle der Proteoglykane bei der Bildung der spezifischen Sites wird diskutiert.

## EINLEITUNG

Die glatte Gefäßmuskulatur stellt einen Effektor im Zusammenspiel vielfältiger Kreislaufregulationen dar. Eine Vielzahl von Zustandsgrößen, wie mechanische Vordehnung, Aktivität der autonomen Innervation, extrazelluläre Ionenaktivitäten und Konzentration von Hormonen und Metaboliten inner- und außerhalb der Zellen wirken in der Gefäßwand zusammen. Sie modulieren den für die Hämodynamik bedeutsamen kontraktile Tonus der glatten Muskelzellen, der eine Funktion der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ist [17,70]. Angriffspunkte der vermittelnden Zustandsgrößen bei der Änderung der cytoplasmatischen  $\text{Ca}^{++}$ -Aktivität sind die Membran der glatten Muskelzellen mit Änderung des Membranpotentials und transmembranaler Ionenflüsse [8,9] sowie die Membran sympathischer Nervenendigungen mit wechselnder Freisetzung adrenerger Transmitter [100].

Zusätzlich kann dem vaskulären Bindegewebe über lokale Aktivitätsänderungen von Alkali- oder Erdalkalimetallionen Bedeutung zukommen. Bei dem hohen Gehalt der Gefäßmedia an interstitiellem Bindegewebe [21,87] mit seinem außerordentlich großen Pool gebundener Kationen [85] können unter geeigneten nicht-stationären Bedingungen erhebliche Mengen von Kationen freigesetzt oder akkumuliert werden [41,86,88,101]. Aus licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, daß glatte Gefäßmuskelzellen von einer Basalmembran und einem feinen Netzwerk von Bindegewebsfasern umspinnen sind [21,80,88]. Dadurch entstehen enge Spalträume zwischen Zellmembran und Bindegewebsstrukturen. In diesen schmalen extrazellulären Flüssigkeitsräumen können schon kleine Mengenfreigesetzter oder gebundener Ionen zu wesentlichen, meßbaren Aktivitätsänderungen führen [101]. Sie beeinflussen transmembranale Ionenflüsse, Membranpotential und mechanische Spannungsentwicklung [88].

In dieser Arbeit werden  $K^+$ -Akkumulation und Kinetik des  $K^+$ -Austausches am isolierten adventitiellen Bindegewebe der *Arteria carotis* des Hundes untersucht. Dies soll als Modell für die physikochemischen Voraussetzungen der Kationenbindung an Mediabindegewebe und ihre Beeinflussung, besonders durch Änderung von extrazellulärem pH-Wert [86] und Ionenmilieu [88,101], dienen. Wichtig für regulatorische Vorgänge ist dabei die Frage nach spezifischer Kationenbindung an diskreten Sites mit Ionenselektivität und möglichen kompetitiven und kooperativen Bindungseffekten.

## METHODIK

### Präparate und Lösungen

Fünf Hunde wurden mit Bolzenschuß in Bewußtlosigkeit bei Atemstillstand versetzt. Die *A. carotis communis* wurde beiderseits chirurgisch entnommen. Bei der lichtmikroskopisch kontrollierten Feinpräparation wurde die äußerste Schicht sehr lockeren perivaskulären Bindegewebes verworfen und die weitgehend zellfreie Adventitia [40,75] unter Meidung der Media strumpftartig abgezogen. Die Präparation erfolgte in  $Ca^{++}$ -freier, modifizierter Krebs-Lösung.

Je drei Bindegewebsfraktionen (30-100 mg Feuchtgewicht) vom gleichen Hund wurden in den drei Versuchsreihen miteinander verglichen. In  $K^+$ -Lösungen der

Konzentrationsstufen 0,469 mM ( $\text{KCl}$  0,269 mM;  $\text{KHCO}_3$  0,1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mM), 4,69 mM ( $\text{KCl}$  2,69 mM;  $\text{KHCO}_3$  1 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM) und 46,9 mM ( $\text{KCl}$  29,21 mM;  $\text{KHCO}_3$  16,31 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,38 mM) wurden die Präparate unter mehrfachem Lösungswechsel eine Stunde gespült, um die Konzentration unerwünschter Ionenspezies auf ein Minimum zu reduzieren. In Lösungen entsprechender Zusammensetzung erfolgten bei  $37^\circ\text{C}$  Äquilibrierung und Effluxexperimente. Die pH-Werte der Lösungen wurden durch Einleiten variabler  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ -Gasgemische möglichst nahe pH 7 eingestellt. Sie lagen bei 6,5 (0,469 mM  $\text{K}^+$ ), 6,7 (4,69 mM  $\text{K}^+$ ) und 7,0 (46,9 mM  $\text{K}^+$ ).

Die Titrationsversuche wurden in modifizierter Krebslösung bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt:  $\text{Na}^+$  151,16;  $\text{K}^+$  4,69;  $\text{Ca}^{++}$  2,52;  $\text{Mg}^{++}$  0,11;  $\text{Cl}^-$  143,42;  $\text{HCO}_3^-$  16,31;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1,38; Glucose 7,77 mM. Die pH-Stufen 4 und 5 wurden durch Titration mit  $\text{HNO}_3$  (65%) erreicht, pH 6, 7 und 8 mittels Durchperlen der Lösung mit verschiedenen  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ -Gasgemischen und pH 9 durch Zugabe von  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%).

#### *Bestimmung der Ionenkonzentrationen*

Die Gesamtkonzentration der Ionen im Bindegewebe wurde nach mindestens dreistündigem Äquilibrieren in Kaliumlösungen verschiedener Konzentrationsstufen mit einem Atomabsorptionsspektrophotometer (Perkin-Elmer, Modell 403, Norwalk, U.S.A.) gemessen. Nach Bestimmung des Feucht- und Trockengewichts wurden die Proben in reinem Sauerstoff mit Pt-Katalysator in einem eisgekühlten Quarzkolben verbrannt. Die gasförmigen Produkte wurden in 1,3%iger  $\text{HNO}_3$ -Lösung aufgenommen. Mit dieser Flüssigkeit wurden die Atomabsorptionsmessungen für Na, K und Mg durchgeführt. Ca wurde nach Zusatz 2%iger Lanthannitrat-Lösung gemessen, Cl nach quantitativer Präzipitation mit  $\text{AgNO}_3$  durch Bestimmung des Überschusses an Ag. Der Gesamtfehler der Methode liegt bei  $< \pm 3\%$  [88].

#### *$^{42}\text{K}^+$ -Fluxmessungen*

Die Präparate wurden mindestens 3 h lang in radioaktiven  $\text{K}^+$ -Lösungen verschiedener Konzentrationsstufen mit  $^{42}\text{K}^+$  als Tracer bis zur Sättigung aufgeladen. Die Aktivität von  $^{42}\text{K}^+$  in den Badlösungen lag bei 10–220 mCi/nmol  $\text{K}^+$  ( $\approx 0,05$ –1 mCi/ml), je nach Konzentrationsstufe und Versuchsbeginn. Die Ausgangsaktivität nach Neutronenaktivierung betrug 45,67 (Stufe 46,9 mM  $\text{K}^+$ ) bzw. 456,7 mCi/nmol K (Stufen 0,469 und 4,69 mM  $\text{K}^+$ ) bei einer Halbwertszeit von 12,46 h. Die

Aktivität anderer Isotope, hauptsächlich von  $^{38}\text{Cl}$  (HWZ 37,3 min;  $\gamma$ -Strahlung 2,17 MeV, 1,64 MeV), erreichte initial etwa ein Fünftel der  $^{42}\text{K}$ -Aktivität und war bei Beginn der Versuche zu vernachlässigen.

Nach standardisiertem Abpressen in Filterpapier und Bestimmung des Feuchtgewichts erfolgte das Auswaschen der Präparate in inaktiven Lösungen gleicher Zusammensetzung. Die Aktivität im Präparat und Eluat wurde mit VIP Series Coaxial Ge(Li)-Detektoren (Ortec, Oak Ridge, U.S.A.; Signalhöhe zu Compton-Plateauhöhe 30:1, Auflösung 2,2 keV bei 1,333 MeV Photonenenergie) in Verbindung mit stabilisierten Einkanalanalysatoren (Elscint, SCA-N-3, Haifa, Israel) als  $\gamma$ -Strahlung bei 1,52 MeV kontinuierlich über 40 min verfolgt und in Intervallen von 10 s akkumuliert und ausgegeben (Intertechnique, DIDAC 4000, Plaisir, France), entweder über Lochstreifen (Tally, Kent, U.S.A.) oder als Ausdruck über eine Combित्रon S (Diehl, Berlin, Deutschland) (vgl. Abb. 1). Während der Messung wurde in der Meßkammer (Abb. 2) ein konstanter und laminarer Fluß der inaktiven Spüllösung aufrechterhalten, wobei die Kammerflüssigkeit etwa 1,2mal pro Sekunde vollständig ausgetauscht wurde (Kammervolumen 2,3 ml, Flußrate 160 ml/min). Versuche mit Farbstoffindikatoren bestätigten die günstigen Strömungsverhältnisse. So wurde die Anhäufung von Tracerionen in der Meßkammer, im Interstitium und auf der Oberfläche des Präparates verhindert. Andernfalls wäre mit einer Limitierung der Austauschkinetik durch die Kammergeometrie zu rechnen. Bildung und Fortleitung von Gasblasen im Spülsystem wurden durch gleichmäßige Temperierung der Spüllösung und Blasenfallen verhindert. Nach jedem Experiment wurden die Gehalte an Na, K, Mg, Ca und Cl im Präparat und in Bad- und Spüllösung mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt.

Bei den  $^{42}\text{K}^+$ -Influxexperimenten in kaliumlösung und modifizierter Krebslösung (jeweils  $[\text{K}^+] = 4,69 \text{ mM}$ ) wurden Feuchtgewichte (10-40 mg), Wassergehalt, Ionengehalt (AAS) und Aktivitätsverlauf nach Inkubation in radioaktiver Lösung für 1, 3, 5, 8, 15, 30, 60, 120, 180, 840, 2280, 3720, 5160, 6600, 8040, 9480 Minuten bestimmt. Die Präparate wurden zuvor in entsprechenden inaktiven Lösungen über 3 h äquilibriert.

## ERGEBNISSE

### *Wasser- und Ionengehalte*

In Tab. 1 und 2 sind die Wasser- und Ionengehalte der Bindegewebspräparate nach 3-14 h Äquilibration in den verschiedenen  $K^+$ -Lösungen und in modifizierter Krebslösung zusammengestellt. Erwartungsgemäß steigt mit wachsender  $K^+$ -Konzentration in der Lösung der Gehalt an gebundenem Kalium auf Kosten von Na, Mg und geringfügig auch Ca. Der Na- und Ca-Gehalt wurde auf pH 7,0 korrigiert [85]. Die Menge gebundenen Kaliums ist in der Krebslösung trotz Kompetition durch andere Kationen höher als in der entsprechenden  $K^+$ -Lösung (4,69 mM).

### <sup>42</sup> $K^+$ -Influxexperimente

In Tab. 2 und Abb. 4 sind die Ergebnisse der <sup>42</sup> $K^+$ -Influxexperimente in Krebs- und Kaliumlösung (4,69 mM) dargestellt. Abb. 4 zeigt ein typisches Influxprofil mit linearem Anfangsteil bei bulk diffusion aus Kompartiment  $S_1$  und angedeuteter Schulter bei Übergang zu vorwiegendem Austausch von  $K^+$  an chemischen Bindungsstellen nach Gl. 3 und 4 [vgl. 48,49]. Dabei entspricht die nichtaustauschende Fraktion 57% des Gesamtkaliumgehalts, die durch Diffusion austauschende Fraktion dem aus Wassergehalt und  $[K^+]_{\text{Bad}}$  berechneten Wert. Nach 180 Minuten, entsprechend der minimalen Inkubationszeit bei den Effluxexperimenten, ist der rasche  $K^+$ -Austausch abgeschlossen: 52% des Gesamtgehalts (33% der gebundenen Fraktion) in der Krebslösung, 66% des Gesamtgehalts (47% der gebundenen Fraktion) in der  $K^+$ -Lösung (Tab. 2).

Im Laufe von mehreren Tagen erfolgt in der  $K^+$ -Lösung ein geringer zusätzlicher Isotopenaustausch von 0,6 mMol/kg Fasern, gleichzeitig aber ein langsamer, erheblicher  $K^+$ -Nettoverlust von 6,9 mMol/kg Fasern ( $\cong$  41% des  $K^+$ -Gesamtgehalts nach 3 h Äquilibration) unabhängig vom Isotopenaustausch (Tab. 2). In Krebslösung ist ein langsamer, vollständiger Isotopenaustausch nach 62-86 h Inkubationszeit erfolgt: 11,3 vs. 10,3 mMol/kg FG bei der Isotopen- bzw. AAS-Messung (Tab. 2).

### <sup>42</sup>K<sup>+</sup>-Effluxexperimente

Die Daten der <sup>42</sup>K<sup>+</sup>-Fluxmessungen vom Bindegewebe wurden um den radioaktiven Zerfall der Tracerionen korrigiert und bei bekannter spezifischer Aktivität auf Konzentrationsangaben [mMol/kg Feuchtgewicht (FG)] umgerechnet. Um den Ionenaustausch quantitativ beschreiben zu können, ist eine Analyse der Auswaschkinetik erforderlich.

#### Kompartiment-Analyse

Eine Möglichkeit besteht in der Anpassung einer n-fach exponentiellen Funktion der Form

$$X(t) = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-b_i t} \quad (1)$$

an die Meßdaten, wobei  $X$  die zur Zeit  $t$  im Präparat vorhandene Aktivität/kg FG oder die korrespondierende Konzentration angibt, während  $A_i$  den Anfangswert zur Zeit  $t=0$  und  $b_i$  die Ratenkonstante der i-ten exponentiellen Funktion bezeichnet.

Dieser Ansatz wurde von zahlreichen Autoren diskutiert und auf biologische Systeme angewendet, wobei gewöhnlich folgende Prämissen gelten [11,42,81,90,93-95]:

1. Der Tracer verhält sich beim Austausch wie die entsprechende unmarkierte Substanz. Für die Diffusion radioaktiver Ionen ist ein Isotopeneffekt zu erwarten, dessen Größe jedoch vom Verhältnis der Atommassen abhängt [5]. Für <sup>42</sup>K<sup>+</sup> vs. <sup>39</sup>K<sup>+</sup> ist er zu vernachlässigen.
2. Für mathematische Zwecke kann jede, durch eine einheitliche Austauschrate definierte Fraktion des Tracers im biologischen System so behandelt werden, als befände sie sich in einem abgrenzbaren Raum oder einem Kompartiment [84]. Die Fraktionen können durch morphologische, chemische oder physikalische Faktoren bestimmt sein. Die Grenzen der Kompartimente können, brauchen aber keinesfalls anatomischen Gegebenheiten entsprechen.
3. Tracer und entsprechende unmarkierte Substanz sind stets gleichmäßig im Kompartiment verteilt. Die Durchmischung ist im Vergleich zum Transport über die Grenzen zwischen Kompartimenten praktisch unendlich schnell [78].

Mit diesen Annahmen ist im stationären Zustand das beobachtbare Austauschverhalten des Tracers von der Reaktionsordnung der Transportvorgänge an den Kompartimentgrenzen unabhängig. Die mathematische Formulierung des Tracer-austauschs liefert Reaktionen 1. Ordnung [46,72].

Nach Gl. 1 wurden  $A_i$  und  $b_i$  durch ein Fitprogramm, das einen Algorithmus für least squares estimates nichtlinearer Parameter benutzt [55], mit Hilfe einer EDV-Anlage (Computer GmbH, TR 440, Konstanz, Deutschland) iterativ berechnet. Dabei werden die einzelnen Meßpunkte entsprechend ihrer Streuung gewichtet. Die mathematische Formulierung der Tracerfluxe in einem Mehrkompartimentsystem mit Austausch aller Kompartimente untereinander wurde in allgemeiner Form von verschiedenen Autoren angegeben [78,79,95]. Die Lösung der Austauschgleichungen bereitet Schwierigkeiten, wenn nur der Aktivitätsverlauf im Gesamtpräparat bekannt ist. Dieser wird durch die Größe der Kompartimente  $S$ , die kinetischen Koeffizienten  $k$  der unidirektionalen Tracerfluxe zwischen benachbarten Kompartimenten sowie die Anzahl und Anordnung der Kompartimente bestimmt. Bei solcher Vielzahl von Variablen müssen zur eindeutigen Bestimmung eines Austauschmodells einzelne Kompartimente isoliert oder bestimmte Einschränkungen zur Anordnung der Kompartimente angenommen werden. Methodisch kommt für die Interpretation des Aktivitätsverlaufs im Bindegewebspräparat nur die zweite Möglichkeit in Betracht, die von HAAS [30] beschrieben wurde.

Danach sind für das Bindegewebe mindestens so viele Kompartimente anzunehmen, wie  $e$ -Funktionen zur Beschreibung des Aktivitätsverlaufs nach Gl. 1 erforderlich sind. Von diesen drei Kompartimenten kann das mit dem schnellsten Austausch ( $S_1$ ) dem Gewebswasser zugeordnet werden. Der Austausch der weiteren Kompartimente ( $S_2, S_3$ ) untereinander und mit der Badlösung soll über  $S_1$  erfolgen, eine plausible Annahme, wenn  $S_2$  und  $S_3$  anionische Bindungsstellen auf den linearen Polyelektrolytstrukturen des Bindegewebes repräsentieren.

Mit dem von HAAS [31] angegebenen Rechenverfahren können aus den Parametern der Effluxkurven die Kompartimente  $S$  und kinetischen Koeffizienten  $k$  berechnet werden.

$$S_1 = \frac{(A_1 b_1 + A_2 b_2)^2}{A_1 b_1^2 + A_2 b_2^2} ; \quad S_2 = \frac{(b_1 - b_2)^2}{A_1 b_1^2 + A_2 b_2^2} A_1 A_2 \quad (2)$$

$$k_{21} = \frac{(A_1 b_1 + A_2 b_2) b_1 b_2}{A_1 b_1^2 + A_2 b_2^2} ; \quad k_{10} = \frac{A_1 b_1^2 + A_2 b_2^2}{A_1 b_1 + A_2 b_2} \quad (2)$$

Für Bindungsstellen mit einem gegenüber  $S_1$  und  $S_2$  vergleichsweise sehr langsamen Austausch ergibt sich approximativ  $S = A$ ,  $k = b$  [13,30]. Bei schnellem Austausch mit einer kürzeren Zeitkonstante als für den Austausch zwischen Gewebswasser und Badlösung fallen beide Vorgänge in Gl. 1 in einer exponentiellen Funktion mit entsprechend größerer Amplitude zusammen [13,30]. Strukturell gebundene, nicht austauschbare Kationen führen zu einer Differenz zwischen Gesamtgehalt und Summe der Austauschfraktionen.

In Tab. 3 sind die Parameter der dreifach-exponentiellen Effluxkinetik für die Versuchsreihen in den verschiedenen  $K^+$ -Lösungen zusammengefaßt. Typische Effluxkurven sind in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich eine sehr genaue Übereinstimmung der experimentellen Werte mit den errechneten Exponentialfunktionen.

#### Bulk diffusion und Adsorption

Der Kationenaustausch im Kompartimentmodell ist durch einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt an den Kompartimentgrenzen charakterisiert. Diese Annahme ist für den Austausch zwischen Gewebswasser und Badlösung unbefriedigend. Spannt man isoliertes Bindegewebe in Form einer dünnen Membran in der Meßkammer auf, dann kann der Kationenaustausch durch zwei gleichzeitig ablaufende Vorgänge beschrieben werden: Bulk diffusion in einer homogenen Membran, die beidseits an ein unendlich großes Bad grenzt, und reversible chemische Reaktion der Kationen mit kolloidalen Bindungsstellen (Adsorption/Desorption), die gleichmäßig über die Membrandicke verteilt sind, wobei sich ein nichtdiffusibles Reaktionsprodukt bildet.

Die mathematische Lösung dieses Problems wurde von CRANK [13] beschrieben. Der Austausch folgt der Gleichung

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \frac{\partial S}{\partial t} , \quad (3)$$

die einen Term für bulk diffusion in  $x$ -Richtung und eine chemische Reaktion

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \lambda C - \mu S \quad (4)$$

enthält. Die Symbole bezeichnen:  $D$  Diffusionskoeffizient;  $\lambda$ ,  $\mu$  Ratenkonstanten der Hin- und Rückreaktion;  $C$  Konzentration der diffusiblen Fraktion der betrachteten Substanz;  $S$  Konzentration der immobilisierten Substanz;  $R = S/C$ ;  $x$  Raumkoordinate senkrecht zur Membranoberfläche mit  $-a \leq x \leq a$ ;  $a$  halbe Schichtdicke der Membran.

Die Gl. 3 und 4 wurden über Schichtdicke und Zeit integriert und in der von CRANK [13] vorgeschlagenen Weise gelöst (vgl. Appendix). Dabei wurden folgende Parameter verwendet:  $R = S_2/S_1$ ;  $\mu = k_{21}$ ;  $D/a^2$  wurde zunächst aus der gemessenen Schichtdicke und dem Wert für freie Diffusion von  $K^+$ -Ionen in Wasser berechnet. Eine optimale Anpassung der theoretischen Kurven an die experimentellen Daten ergab sich mit etwas niedrigeren Werten für  $D$  und  $R$  (Tab. 4).

Zusätzlich wurde ein Term für eine zweite, sehr viel langsamere, reversible chemische Reaktion mit den Parametern  $R^* = S_3/S_1$  und  $\mu^* = k_{31}$  in Gl. 3 aufgenommen und so behandelt, als verlaufe die Diffusion unendlich schnell [13]. Der dadurch eingeführte Fehler ist für kleine Werte von  $\mu a^2/D$ , die in den drei Versuchsreihen bei 0,07-0,08 liegen, gering. Zusätzlich sinkt der relative Fehler dieser Vereinfachung mit Abnahme von  $R$  [13], so daß in den drei Versuchsreihen die maximale Abweichung für  $M_t/M_\infty$  bei  $< 0,2\%$  ( $[K^+]_{\text{Bad}} = 0,469 \text{ mM}$ :  $S_3/S_1 = 0,37$ ) bzw.  $< 0,1\%$  ( $[K^+]_{\text{Bad}} = 4,69 \text{ mM}$ :  $S_3/S_1 = 0,16$ ;  $[K^+]_{\text{Bad}} = 46,9 \text{ mM}$ :  $S_3/S_1 = 0,02$ ) liegt. Schnell ablaufende chemische Austauschvorgänge können in der Kinetik der bulk diffusion verborgen sein und sich in einer Erhöhung von  $S_1$  und Erniedrigung von  $D$  manifestieren [13].

In Tab. 4 und Abb. 6 sind die theoretischen Werte und drei Einzelversuche für bulk diffusion und gleichzeitige chemische Bindung an zwei Sites dargestellt. In Anlehnung an CRANK [13] werden die dimensionslosen Parameter  $M_t/M_\infty$  und  $(Dt/a^2)^{\frac{1}{2}}$  verwendet, wobei  $M_t/M_\infty$  die aufgenommene Fraktion zur Zeit  $t$  und  $M_\infty$  der Sättigungswert ist. Die Darstellung der Effluxversuche in Form theoretischer Influxkurven nach einfacher mathematischer Inversion [49] ermöglicht

die Unterscheidung von bulk diffusion und surface-limited diffusion für  $\mu_1$  schon nach dem allgemeinen Kurvenverlauf, entsprechend dem Auftreten eines linearen oder sigmoiden Anfangsteils [13,49].

Abb. 6 zeigt einen praktisch linearen Anfangsteil für den  $^{42}\text{K}^+$ -Austausch am Bindegewebe, der somit gut durch bulk diffusion aus dem Gewebswasser und gleichzeitige chemische Bindung an zwei Sites repräsentiert wird. Zwar findet sich bei sorgfältiger graphischer Analyse ein leicht sigmoider Anfangsteil. Der Vergleich mit der theoretischen Kurve zeigt aber, daß dies nicht Ausdruck einer surface-limited diffusion aus  $S_1$  ist, sondern bei relativ hohem Wert für  $\mu a^2/D$  (Tab. 4: 0,7-1,0) den beginnenden Austausch aus  $S_2$  anzeigt, der formal surface-limited abläuft. Da die Austauschgeschwindigkeiten für  $S_1$  und  $S_2$  relativ nahe zusammenliegen, ergibt sich auch keine Schulterbildung im Kurvenverlauf, wie sie in Abb. 4 für  $\mu a^2/D = 0,1$  angedeutet ist.

#### *Reaktionskinetisches Modell*

Die Analyse der  $^{42}\text{K}^+$ -Effluxkinetik nach dem Kompartimentmodell oder im Sinne von bulk diffusion und gleichzeitiger chemischer Reaktion liefert verschiedene Deutungen der schnellsten Austauschfraktion. Jedoch sind die kinetischen Koeffizienten für die langsameren Austauschfraktionen in allen Versuchsreihen gleich und untereinander einheitlich (Tab. 3 und 4). Die kinetischen Koeffizienten sind Ausdruck der Austauschverzögerung durch chemische Bindung und Affinität der Bindungsstellen für  $\text{K}^+$ -Ionen. Die Einheitlichkeit der kinetischen Koeffizienten unter verschiedenen Versuchsbedingungen zeigt, daß sich die negativ geladenen Gruppen in den Präparaten nach ihrer Kaliumakkumulation in wenige Klassen von Bindungsstellen (Sites) mit einheitlichen intrinsischen Affinitätskonstanten für  $\text{K}^+$  aufteilen lassen [82]. Die Fraktion der mit  $\text{K}^+$  besetzten Sites einer Klasse entspricht einem experimentell bestimmten Kompartiment im Traceraustausch.

Die Ableitung von Gleichgewichtskonstanten für die Bindungsreaktionen nach dem Massenwirkungsgesetz aus einer Austauschkinetik im stationären Zustand ist nur möglich, wenn mehrere Messungen bei geeigneter Variation der Versuchsbedingungen vorliegen, z.B. bei verschiedenen Reaktandenkonzentrationen [12, 84]. Die Effluxdaten für unterschiedliche  $\text{K}^+$ -Konzentrationen der Badlösung erlauben die Berechnung der intrinsischen Affinitätskonstanten, wenn die Ver-

weildauer der  $K^+$ -Ionen an den Bindungsstellen allein geschwindigkeitsbestimmend für den Austausch zwischen Gewebswasser sowie  $S_2$  und  $S_3$  ist, und ferner die Auswirkung der gleichzeitig geänderten Ionenstärke der Badlösung erfaßt werden kann.

Die Kaliumbindung soll an die linearen Polyelektrolyte des Bindegewebes erfolgen, die für jede Klasse von Sites  $S$  eine bestimmte Anzahl  $n$  diskreter und unabhängiger Bindungsstellen für  $K^+$  mit gleicher intrinsischer Affinitätskonstante  $K_A$  tragen. Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes ergibt für die Geschwindigkeit  $v$  von Hin- und Rückreaktion

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1 \cdot [K^+] \cdot [S^-] \\ v_2 &= k_2 \cdot [SK] \end{aligned} \quad (5)$$

Die Anzahl besetzter Sites  $SK$  strebt mit steigender Konzentration  $[K^+]$  in der Badlösung einem Sättigungswert  $B$  zu

$$[S^-] = B - [SK].$$

Für Versuche bei verschiedenen Konzentrationen  $[K^+]_m$  und  $[K^+]_n$  gilt unter stationären Bedingungen

$$\frac{v_m}{[K^+]_m \cdot [S^-]_m} = \frac{v_n}{[K^+]_n \cdot [S^-]_n} \quad (6)$$

$[K^+]$  und  $[SK]$  werden direkt gemessen. Für die Konzentration unbesetzter, aber besetzbarer Sites gilt

$$[S^-]_m = ([SK]_m - [SK]_n \cdot \frac{n_m}{n_n}) / \left( \frac{v_n \cdot [K^+]_m}{v_m \cdot [K^+]_n} - 1 \right)$$

und für die intrinsische Affinitätskonstante

$$K_A = \frac{[SK]}{[S^-] \cdot [K^+]} \quad (7)$$

$$K_A = \frac{v_m [K^+]_n - v_n [K^+]_m}{(v_n - v_m) \cdot [K^+]_m \cdot [K^+]_n} \quad (8)$$

Formal entspricht Gl. 8 einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik. Wesentlich ist die experimentelle Trennung von  $[CK]$  und  $v_2$  bei der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten (Gl. 5). So kann in Lösungen verschiedener  $K^+$ -Konzentration und Ionenstärke die Änderung der Kaliumbindung am Bindegewebe zu Änderungen der Anzahl verfügbarer Sites  $n$  oder der intrinsischen Affinitätskonstanten von  $S_2$  und  $S_3$  zurückverfolgt werden.

### Affinitätskonstanten

Tab. 3 zeigt, daß sich die Kompartimente konzentrationsabhängig teilweise in stärkerem Maße als das  $[K^+]$ -Verhältnis der entsprechenden Lösungen ändern. Da die kinetischen Koeffizienten praktisch konzentrationsunabhängig sind, ist nach Gl. 5-7 von einer zunehmenden Anzahl  $n$  austauschender Sites mit steigender  $K^+$ -Konzentration und Ionenstärke in den in Tab. 5 genannten Grenzen auszugehen. Da  $n$  aus den experimentellen Daten nicht eindeutig abzuleiten ist, ferner  $K_A$  und  $n$  rechnerisch voneinander abhängen, gibt Tab. 5 nur die Mindestwerte der Affinitätskonstanten von  $S_2$  und  $S_3$  für die  $K^+$ -Bindung: 250 bzw. 1000 l/Mol.

## DISKUSSION

### Morphologie und Heterogenität vaskulären Bindegewebes

Der Extrazellulärraum der glatten Gefäßmuskulatur ist groß [21]. Während im Skelettmuskel 7-10% darauf entfallen [37,48], geben SIEGEL *et al.* [88] 57,4% für den extrazellulären Raum der *arteria carotis* des Hundes an, der aus Flüssigkeitsraum und interstitiellem Bindegewebe besteht. Entsprechend ist der Gehalt der Gefäßwand an Kollagen und Elastin hoch [21]. Kollagen tritt hier in Form von Fibrillen auf, die im Mediabindegewebe einen gleichmäßigen Durchmesser von 30 nm, in der Adventitia wechselnd über 50 nm haben [21,59,63]. Die Fibrillen bestehen aus spiralg angeordneten Filamenten ( $\approx 3,0-3,5$  nm), Aggregaten von jeweils fünf Tropokollagen-Makromolekülen [92], die wiederum aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind. In den Maschen des fibrillären Netzwerks und interfilamentär ist eine kohlenhydratreiche Matrix nachweisbar [6,69].

Proteoglykane und möglicherweise Glycoproteine sind die wesentlichen Kohlenhydratbestandteile des Bindegewebes [59]. Proteoglykane besitzen einen Proteinkern, an den flaschenbürstenartig Glycosaminoglykan(GAG)-Ketten gebunden sind [58,60]. Die Glycosaminoglykane sind lineare Polymere, deren Disaccharideinheiten in der Regel aus einem Hexosamin- und einem Uronsäurerest mit wechselnder Zahl von Sulfatresten bestehen. Die Prototypen der GAG-Ketten in Bindegewebsproteoglykanen mit zugehörigen Disaccharideinheiten und durchschnittlicher Ladungsdichte (Carboxyl- und Sulfatgruppen pro Disaccharideinheit) sind [12,59]:

| Prototyp             | Disaccharideinheit                                                                                    | Ladungsdichte |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Chondroitin-4-sulfat | -N-Acetyl-D-Galactosamin- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-                                                | 1,1 - 2,0     |
| Chondroitin-6-sulfat | D-Glucuronsäure- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-                                                         | 1,2 - 2,3     |
| Dermatansulfat       | -N-Acetyl-D-Galactosamin- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-<br>L-Iduronsäure- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)- | 2,0 - 2,2     |

Im Gewebe kommen verschiedene Disaccharideinheiten gemeinsam in einer GAG-Kette vor [59]. Zusätzlich können Keratansulfat, Heparansulfat und Heparin auftreten. Hyaluronat scheint nicht Bestandteil der Proteoglykane zu sein, sondern an der Bildung von Proteoglykan-Aggregaten Anteil zu haben [32,35]. Die quantitative Zusammensetzung der GAG-Ketten ist abhängig von Species [18, 22], Gefäßtyp [18,34,65,83], Muskelschicht der Gefäßwand [14,38] und Alter [38,59,62,83]. Für verschiedene arterielle Gefäße und Species finden sich etwa 10-20 g GAG/kg Trockengewicht (*Tunica media*) [18,38,39,65,83,89], 60-200 g Kollagen und 140-250 g Elastin/kg Trockengewicht [21,38,39].

Die Untersuchung des leicht isolierbaren, adventitiellen Bindegewebes soll die physiologische Bedeutung des interstitiellen Bindegewebes der *Tunica media* erhellen. Bei sehr ähnlicher Zusammensetzung enthält die Adventitia einen höheren Anteil an Dermatansulfat als Chondroitinsulfat [22,34]. Damit korreliert das Auftreten dickerer Kollagenfibrillen in der Adventitia, denn die bevorzugte Bildung von Kollagenaggregaten mit Dermatansulfat ist bekannt [23-25, 57,66-68,97]. Über die Stereochemie der Makromolekülaggregate im vaskulären Bindegewebe ist wenig bekannt, so daß die biologisch interessante Bindung von anorganischen Kationen meist global dem Gesamtgewebe und nicht chemisch definierten Bindungsstellen zugeschrieben wird.

### *Titrationsskurve*

Aufgrund der Elektroneutralität im Präparat läßt sich aus dem Gehalt an kleinen Ionen die Nettoladungsdichte des Bindegewebes als Differenz der Konzentrationen fixer anionischer und kationischer Gruppen berechnen [10]. Abb. 3 stellt die aus AAS-Messungen von Na, K, Mg, Ca und Cl bestimmte pH-Abhängigkeit der Nettoladungsdichte unter der Annahme einer Gleichverteilung mobiler Anionen und reiner Ionenbindung zwischen mobilen und fixen Ionen dar.

Kurvenverlauf und Lage des isoelektrischen Punktes bei pH 5,5 entsprechen denen von Titrationsskurven an reinen Kollagenpräparaten [10,29], ebenso ein negativer Ladungsüberschuß von 100-120 meq/kg Fasern bei pH 7,4 [29]. Diese Werte liegen deutlich über dem Gehalt des Bindegewebes an spezifischen Sites  $S_2$  und  $S_3$ , wie sie durch die Austauschkinetik definiert wurden (maximal 24 meq/kg Fasern bei pH 7,0, Tab. 5), jedoch noch deutlich unter dem Überschuß anionischer Gruppen von Kollagen nach seiner Aminosäuresequenz [29,59]. Damit sind chemische Analysen des Bindegewebes zur Bestimmung der Konzentration spezifischer Sites weitgehend ungeeignet, wie sie für ein reaktionskinetisches Modell bekannt sein muß, zumal die chemische Identität der Sites unklar ist. Kollagen sollte mit seinem Überschuß anionischer Gruppen erheblich zur unspezifischen Kationenbindung beitragen.

### *Kationenbindung am Bindegewebe*

Die Bindung von Kationen an Bindegewebsstrukturen ist von MATHEWS [69], REES [74] sowie COMPER und LAURENT [12] in Übersichtsarbeiten diskutiert worden. Die fixen ionisierten Gruppen "binden" zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität Gegenionen. Je nach Bindungstyp ergibt sich eine ganz unterschiedliche Beeinflussung thermodynamischer Parameter (Austauschraten, osmotische Koeffizienten, Aktivitäts-, Verteilungs-, Diffusionskoeffizienten).

- a) Eine "diffuse" [30] oder "statistische" [74] Bindung entsteht aufgrund der elektrostatischen Interaktion von fixen und mobilen Ladungen.
- b) Polyelektrolyte, deren analytische Ladungsdichte einen kritischen Wert überschreitet, zeigen besondere elektrostatische Bindungsphänomene ("free", "uncondensed", "condensed" counterions nach MANNING [51-53]). Die quantitative Bestimmung dieses Polyelektrolyteffektes mit statistisch-mechanischen

Modellen ist in einfachen Systemen möglich [51,52,99], bei der Heterogenität biologischer Bindegewebspräparate aber unmöglich. Grundsätzlich erlauben sie keine "spezifische Bindung" an diskrete Sites mit räumlicher und zeitlicher Zuordnung gebundener Kationen und keine Ionenselektivität [12,43, 53,64,98].

- c) Gegenionen können mit diskreten Sites von Polyelektrolyten Komplexbindungen eingehen [74]. Dabei spielen neben Ladungsdichte und -verteilung des Polyelektrolyten und Ladung der Gegenionen besonders die stereochemische Anordnung von polaren und ionisierten Gruppen im Bereich der Sites eine Rolle, ihre Übereinstimmung mit der bevorzugten Koordinationsgeometrie der Gegenionen sowie Hydratationsänderungen bei der Bindung [28,64,74,96].

Experimentell wurde an isolierten Sites diese "spezifische" Bindung mit spektroskopischen Methoden bestätigt [2,3,47,64,85,96]. Eine Übersicht spezifischer Kationenbindung an anionische Polysaccharide findet sich bei REES [74]. SIEGEL *et al.* [85] konnten mit  $^{23}\text{Na}$ -Kernresonanzmessungen am vaskulären Bindegewebe der *A. carotis* des Hundes neben diffuser Bindung zwei Sites mit verschiedenen, sehr hohen Bindungsaffinitäten für  $\text{Na}^+$  sowie deutlicher Selektivität der Kationenbindung nachweisen. Selektivität der Kationenbindung an Glycosaminoglykane und Proteoglykane wurde verschiedentlich beschrieben [7, 15,16,36,54,71,96].

RICE *et al.* [33,76,77] wandten einfache Reaktionsgleichungen nach dem Massenwirkungsgesetz auf die Bindung an diskrete Sites von Polyelektrolyten an, um intrinsische Affinitätskonstanten abzuleiten. Ähnlich wurde die Kationenbindung von anionischen Polysacchariden, Proteoglykanen und Proteinen interpretiert [44,50,56]. Dabei wurde die chemische Konzentration anionischer Gruppen im Polyelektrolytssystem mit der Konzentration austauschender Sites gleichgesetzt. Diese Annahme muß fehlerhaft sein, wenn (1) den Sites eine bestimmte sterische Anordnung mehrerer anionischer und polarer Gruppen mit (2) der Möglichkeit makromolekularer Interaktion (z.B. GAG-Kettenassoziation) zugrundeliegt, wenn (3) Sites mit verschiedenen Bindungsaffinitäten gleichzeitig mit (4) struktureller Bindung als Extremfall auftreten, oder wenn (5) makromolekulare Wechselwirkungen site-bildende Gruppenblockieren.

### *Spezifische Sites am Adventitia-Bindegewebe*

SIEGEL *et al.* [85] haben Glycosaminoglykane und Proteoglykane mit  $^{23}\text{Na}$ -NMR-Spektroskopie untersucht und Bindungsstellen mit hoher Affinität und Selektivität für die Kationenbindung nachweisen können. In Übereinstimmung damit zeigen die  $^{42}\text{K}^+$ -Effluxexperimente am adventitiellen Bindegewebe der *A. capensis* des Hundes eine Austauschkinetik, die durch die Annahme von zwei Klassen diskreter Sites mit hoher  $\text{K}^+$ -Affinität ( $\log K_A \geq 2,4$  bzw. 3,0) erklärbar ist.

Die chemischen Grundlagen solch hoher Bindungsaffinitäten sind trotz der heterogenen Struktur des Bindegewebes eingrenzbar. Eine kovalente Bindung von Kalium an die fixen anionischen Gruppen der Bindegewebsmakromoleküle, besonders die Carboxyl- und Sulfatestergruppen, ist nicht anzunehmen [12,59,64]. Elektrostatistische Interaktion nach Art der statistischen Bindung mit oder ohne Polyelektrolyteffekte kann die hohe Affinität nicht allein begründen. Anders als Kollagen und Elastin bieten sich jedoch die Proteoglykane zur Bildung von Komplexen mit kleinen Kationen an. Schon bestimmte neutrale Zucker können Komplexe von erheblicher Stabilität mit ein- und zweiwertigen anorganischen Kationen bilden [1], wenn die Anordnung mehrerer Hydroxylgruppen unter Verdrängung von Wassermolekülen aus der Hydratationshülle des Kations mit der Koordinationssphäre des Kations korrespondiert. Diese Übereinstimmung ist für die Anordnung axial-äquatorial-axial im Pyranose-Ring und Ionen mit einem Radius nahe 0,1 nm ( $\text{Na}^+$  0,095 nm,  $\text{Ca}^{++}$  0,099 nm) bekannt [2].

Durch Einfügen anionischer Gruppen überlagern sich sterische und elektrostatistische Einflüsse. GOULD und RANKIN [26] fanden Stabilitätskonstanten von  $30\text{-}100 \text{ l}\cdot\text{Mol}^{-1}$  für Ca-Komplexe von Uronsäuremonomeren, wobei die Galacturonatkomplexe stabiler als die Glucuronatkomplexe sind [3,26]. Das Verhalten dieser Proteoglykanbausteine findet sich bei isolierten anionischen Polysacchariden in wässriger Lösung wieder. Wohluntersucht sind Alginat-, polymere Verbindungen von D-Mannuronsäure und L-Guluronsäure. Sie besitzen eine hohe Affinität und Selektivität für die Bindung von Alkali- und Erdalkalimetallionen [1,35]. Dabei ist der Gehalt an L-Guluronsäure, die eine "Ax-äq-ax"-Konfiguration von Hydroxylgruppen enthält, entscheidend für die Bindung, wobei  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{++}$  bevorzugt werden [1,36]. Bemerkenswert an diesem Modell ist die Analogie zur stärkeren Kationenbindung von Dermatansulfat gegenüber Chondroitin-4-sulfat, deren C5-epimere Uronsäurekomponenten (L-Iduronsäure bzw. D-Glucuron-

säure) jeweils die C2-Epimeren von L-Guluronsäure und D-Mannuronsäure sind [7,16,56,59].

Die Bindungseigenschaften der Polyanionen sind in komplexer Weise von Sekundär- und Tertiärstruktur abhängig [4,27,73]. Die GAG-Ketten in den flaschenbürstenartig gebauten Proteoglykanen nehmen aufgrund der hohen Ladungsdichte eine weitausgestreckte Form an. Dabei können ionisierte und polare Gruppen mehrerer GAG-Ketten an der Bildung einzelner Sites beteiligt sein, wenn mobile Kationen die negativen Festladungen abschirmen und eine Annäherung der Ketten erlauben [36,45,61]. Computermodelle zur Kettenassoziation in Proteoglykanen [27] ergeben Bindungsstellen, die von mehreren Hydroxyl- und ionisierten Gruppen begrenzt sind, mit auffallender Strukturanalogie zu Kronenäthern [74]. Diese sind starke und selektive Komplexbildner, deren Affinitätskonstante für  $K^+$  typischerweise bei  $\log K_A$  0,6-2,2 liegt [20].

Die Kationenbindung an GAG-Ketten wird zudem durch den Proteinanteil in Proteoglykanen [16,50,85] und durch makromolekulare Interaktion, besonders mit Kollagen, beeinflusst [12,23-25,66-68,74]. Insgesamt zeigen diese theoretischen Überlegungen, daß die chemische Zusammensetzung des Bindegewebes Raum für eine spezifische Bindung von Kationen an diskrete Sites mit hoher Bindungsaffinität läßt. Ferner weisen sie auf die mögliche Rolle der Proteoglykane bei dieser spezifischen Kationenbindung hin.

#### *Strukturelle Kationenbindung*

Im Isotopenexperiment zeigt die  $^{42}K^+$ -Influxkinetik am Bindegewebe für die  $K^+$ -Lösung 4,69 mMol/l nach raschem Erreichen eines Gleichgewichts einen erheblichen Kaliumverlust im Verlauf von Tagen (Tab. 2). Dieser entspricht einer irreversiblen chemischen Reaktion mit Freisetzung gebundenen Kaliums nach Übergang von *in vivo*-Bedingungen in die  $K^+$ -Lösung. Sowohl dieser langsame Kaliumverlust als auch der langsame Isotopenaustausch in Krebslösung während mehrerer Tage nach Erreichen eines ersten Quasigleichgewichts kann auf schlecht austauschbare, "strukturell gebundene" Kationen bezogen werden, wie sie von anderen Polyelektrolytsystemen bekannt sind.

Strukturelle Kationenbindung dokumentiert sich auch im hohen Restgehalt der Präparate an Na, Mg und Ca nach Inkubation in reiner  $K^+$ -Lösung (Tab. 1), der

auch nach Tagen der Äquilibrierung oder Vorbehandlung mit 3 M KCl-Lösung oder Chelatbildnern erhalten bleibt. Da eine Freisetzung strukturell gebundenen Kaliums in  $K^+$ -Lösung als irreversible Reaktion unabhängig vom Isotopenaustausch abläuft und ein geringer reversibler Austausch aus Gründen der Effluxkinetik zu vernachlässigen wäre, erscheint für die Effluxversuche die Annahme eines stationären Zustandes nach Äquilibrierungszeiten von 180-840 Minuten in radioaktiver Lösung trotz niedriger Austauschfraktion gerechtfertigt.

#### *Effektive Site-Konzentration am Bindegewebe*

Die Berechnung einheitlicher Affinitätskonstanten der spezifischen Sites  $S_2$  und  $S_3$ , die durch die  $^{42}K^+$ -Effluxkinetik definiert werden, fordert eine Änderung der Anzahl austauschender Sites in Abhängigkeit von der  $K^+$ -Konzentration bzw. der Ionenstärke der Badlösung (0,469 - 46,9 mMol/l  $K^+$ ). Diesem rechnerischen Erfordernis kommt die physikochemische Möglichkeit einer "Occlusion" von unspezifischen und spezifischen Sites durch ihre sterische Anordnung innerhalb eines Polyelektrolytsystems entgegen [64]. So könnten die in einem feingespinnenen Kollagenmaschenwerk eingebetteten, site-tragenden Proteoglykane bei zunehmender "Verfilzung" durch Aggregation der Kollagenmoleküle untereinander und mit den Proteoglykanen vom schnellen Kationenaustausch ausgeschlossen werden. Zunehmende makromolekulare Wechselwirkungen bei abnehmender Ionenstärke der Badlösung sind wohlbekannt. Der kritische Konzentrationsbereich für die verschiedenen, experimentell bestimmten Parameter der Aggregation liegt meist bei  $10^{-4}$  bis  $10^{-1}$  Mol/l [6,12,23-25,29,59,66-69,74].

*Aggregation und strukturelle Kationensbindung* scheinen Beschreibungen ähnlicher Mechanismen zu sein. So zeigt sich in den Effluxversuchen bei fallender  $K^+$ -Konzentration der Lösung eine deutliche Abnahme der Austauschfraktion (Tab. 3). Die Untersuchungen von MacGREGOR und BOWNESS [50] zur  $Ca^{++}$ -Bindung an Glycosaminoglykanen und Proteoglykanen mit IR-Spektroskopie und Gleichgewichtsdialyse sprechen für zwei verschieden starke Bindungszustände von  $Ca^{++}$  an diskreten Sites. Sie zeigen ein Bindungsverhalten, das bei Ionenstärken  $> 0,15$  M mit einer einfachen Reaktion nach dem Massenwirkungsgesetz vereinbar ist. Mit Abnahme der Ionenstärke fanden die Autoren scheinbar einen deutlichen Anstieg der Affinitätskonstante (Bereich 50-300 l Mol $^{-1}$ ). Da eine mögliche Änderung der effektiven Site-Konzentration mit der Ionenstärke nicht erfaßt wurde, bleibt offen, ob sich die intrinsischen Affinitätskonstanten einzelner Sites

geändert haben oder ob nur die Auswirkung einer wechselnden effektiven Site-Konzentration mit Zunahme struktureller Bindung bei geringer Ionenstärke gemessen wurde. Tab. 2 zeigt, daß der K-Gehalt des Bindegewebes in Krebs-Lösung trotz Konkurrenz durch andere Kationen höher liegt als in reiner  $K^+$ -Lösung mit gleicher  $K^+$ -Konzentration. Wieder kann bei deutlich verschiedener Ionenstärke nicht zwischen veränderter  $K^+$ -Affinität einzelner Sites und einer Änderung der effektiven Site-Konzentration unterschieden werden.

Bei niedriger Ionenstärke der Badlösung kann die effektive Konzentration rasch austauschender Sites  $S_2$ ,  $S_3$  nicht nur durch Occlusion und direkte elektrostatische Interaktion von kationischen Kollagenruppen und polyanionischen GAG-Ketten abnehmen. Niedrige Ionenstärke und damit geringe Abschirmung der hohen Ladungsdichte fixer anionischer Gruppen der GAG-Ketten durch mobile Kationen kann eine Assoziation von GAG-Ketten verhindern, deren Beteiligung an der Bildung spezifischer Sites hoher Affinität vorgeschlagen wird [12,19,27,45,59, 61,74,91]. Daher ergibt sich die methodische Notwendigkeit, die effektive Konzentration spezifischer Sites aus der Austauschkinetik selbst abzuleiten und nicht aus chemischen Analysen, etwa des Gehalts an bestimmten anionischen Gruppen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein solcher Ansatz bei der Ableitung intrinsischer Affinitätskonstanten für die  $K^+$ -Bindung an spezifische Sites verfolgt.

## APPENDIX

Numerische Lösung von Gl. 3 und 4 für Diffusion und gleichzeitige reversible chemische Reaktion in einer Membran der Dicke  $2a$  in einem Bad mit konstanter, gleichmäßiger Zusammensetzung [13]

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2D^2 \cdot k_n^2 (1 + p_n/\mu)^2 \exp(p_n t)}{(R + 1) p_n^2 a^2 [(1 + p_n/\mu)^2 + R]} \quad (1)$$

mit den Lösungen für  $p_n$ ,  $k_n$ :

$$p_n = y \cdot D/a^2 ; \quad k_n^2 a^2 = (n - \frac{1}{2})^2 \pi^2 .$$

$$2y = -(x + \xi) \pm \sqrt{[(x + \xi)^2 - 4x\eta]} \quad (\text{II})$$

$$\xi = a^2(\lambda + \mu)/D$$

$$\eta = a^2\mu/D$$

$$x = k_n^2 a^2$$

$$R = \lambda/\mu$$

$M_t/M_\infty$  läßt sich als Funktion von  $De/a^2$  berechnen, wenn  $R$ ,  $\lambda$  und  $a^2/D$  bekannt sind. Eine Vereinfachung ergibt sich, wenn die aus negativen Quadratwurzeln der Gl. II resultierenden Terme nach Gl. I berechnet werden (schnelle Konvergenz gegen Null) und für Werte von  $p_n$  mit positiven Quadratwurzeln die Gl. III verwendet wird

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^r \frac{2(R+1+p_n/\mu)^2 \exp(p_n t)}{(R+1)[(1+p_n/\mu)^2 + R]k_n^2 a^2} - \frac{R}{R+1} \left(1 - \sum_{n=1}^r \frac{2}{k_n^2 a^2}\right) \exp(-\mu t). \quad (\text{III})$$

Der Fehler durch diese Vereinfachung ist kleiner als

$$\left\{ \frac{(R+1+p_{r+1}/\mu)^2 \exp(p_{r+1} t)}{(R+1)[(1+p_{r+1}/\mu)^2 + R]} - \frac{R}{R+1} \exp(-\mu t) \right\} \left(1 - \sum_{n=1}^r \frac{2}{k_n^2 a^2}\right)$$

und kann durch geeignete Wahl von  $r$  auf die gewünschte Größe reduziert werden. Mit  $r = 10$  oder  $r = 5$  war im vorliegenden Fall der relative Fehler von  $M_t/M_\infty$  stets  $< 0,01\%$ .

## LITERATUR

1. Anyal, S.J.: Complex formation between sugars and metal ions. Pure Appl. Chem. 35, 131-146 (1973).
2. Anyal, S.J., Davies, K.P.: Complexing of sugars with metal ions. Chem. Commun., 500-501 (1971).
3. Anthonsen, T., Larsen, B., Smidsrød, O.: NMR-studies of the interaction of metal ions with poly(1,4-hexuronates). II. The binding of europium ions to sodium methyl  $\alpha$ -D-galactopyranosiduronate. Acta Chem. Scand. 27, 2671-2673 (1973).

4. Atkins, E.D.T., Mackie, W., Parker, K.D., Smolko, E.E.: Crystalline structures of poly-D-mannuronic and poly-L-guluronic acids. *Polymer Lett.* **9**, 311-316 (1971).
5. Bigeleisen, J.: The validity of the use of tracers to follow chemical reactions. *Science* **110**, 14-16 (1949).
6. Bouteille, M., Pease, D.C.: The tridimensional structure of native collagenous fibrils, their proteinaceous filaments. *J. Ultrastruct. Res.* **35**, 314-338 (1971).
7. Buddecke, E., Drzeniek, R.: Stabilitätskonstanten der Calciumkomplexe von sauren Mucopolysacchariden. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **327**, 49-64 (1962).
8. Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W., Tomita, T.: *Smooth muscle*. London: Edward Arnold 1970.
9. Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W., Tomita, T.: *Smooth muscle: an assessment of current knowledge*. London: Edward Arnold 1981.
10. Catchpole, H.R., Joseph, N.R., Engel, M.B.: Thermodynamic relations of polyelectrolytes and inorganic ions of connective tissue. *Fed. Proc.* **25**, 1124-1126 (1966).
11. Comar, C.L.: *Radioisotopes in biology and agriculture*. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company 1955.
12. Comper, W.D., Laurent, T.C.: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* **58**, 255-315 (1978).
13. Crank, J.: *The mathematics of diffusion*. Oxford: Clarendon Press 1970.
14. Dalferes, E.R., Ruiz, H., Kumar, V., Radhakrishnamurthy, B., Berenson, G.S.: Acid mucopolysaccharides of fatty streaks in young, human male aortas. *Atherosclerosis* **13**, 121-131 (1971).
15. Dunstone, J.R.: Ion-exchange reactions between cartilage and various cations. *Biochem. J.* **77**, 164-170 (1960).
16. Dunstone, J.R.: Ion-exchange reactions between acid mucopolysaccharides and various cations. *Biochem. J.* **85**, 336-351 (1962).
17. Endo, M., Kitazawa, T., Yagi, S., Iino, M., Kakuta, Y.: Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. In: *Excitation-contraction coupling in smooth muscle*, edited by Casteels, R., Godfraind, T., Rüegg, J.C., pp. 199-209. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1977.
18. Engel, U.R.: Glycosaminoglycans in the aorta of six animal species. *Atherosclerosis* **13**, 45-60 (1971).
19. Fransson, L.-Å.: Interaction between dermatan sulphate chains. I. Affinity chromatography of copolymeric galactosaminoglycans on dermatan sulphate-substituted agarose. *Biochim. Biophys. Acta* **437**, 106-115 (1976).
20. Frensdorff, H.K.: Stability constants of cyclic polyether complexes with univalent cations. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 600-606 (1971).
21. Gabella, G.: Smooth muscle cell junctions and structural aspects of contraction. *Br. Med. Bull.* **35**, 213-218 (1979).
22. Gardais, A., Picard, J., Hermelin, B.: Glycosaminoglycan (GAG) distribution in aortic wall from five species. *Comp. Biochem. Physiol.* **44B**, 507-515 (1973).

23. Gelman, R.A., Blackwell, J.: Interactions between mucopolysaccharides and cationic polypeptides in aqueous solution: chondroitin 4-sulfate and dermatan sulfate. *Biopolymers* 12, 1959-1974 (1973).
24. Gelman, R.A., Glaser, D.N., Blackwell, J.: Interaction between chondroitin-6-sulfate and poly-L-arginine in aqueous solution. *Biopolymers* 12, 1223-1232 (1973).
25. Gelman, R.A., Rippon, W.B., Blackwell, J.: Interactions between chondroitin-6-sulfate and poly-L-lysine in aqueous solution: circular dichroism studies. *Biopolymers* 12, 541-558 (1973).
26. Gould, R.O., Rankin, A.F.: Calcium complexes of uronic acid monomers. *Chem. Commun.* 489-490 (1970).
27. Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D.: Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32, 195-198 (1973).
28. Gregor, H.P.: The modes of specific binding of ions to polyelectrolytes. In: *Charged and reactive polymers, vol. I: Polyelectrolytes*, edited by Sélégny, E., Mandel, M., Strauss, U.P., pp. 87-95. Dordrecht, Boston: D. Reidel Publ. Comp. 1974.
29. Gustavson, K.H.: *The chemistry and reactivity of collagen*. New York: Academic Press 1956.
30. Haas, H.G.: Zur Kinetik des Ionenaustauschs in mehrphasigen Systemen. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 275, 347-357 (1962).
31. Haas, H.G., Glitsch, H.G., Trautwein, W.: Natrium-Fluxe am Vorhof des Froschherzens. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 277, 36-47 (1963).
32. Hardingham, T.E., Muir, H.: Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem. J.* 139, 565-581 (1974).
33. Harris, F.E., Rice, S.A.: A chain model for polyelectrolytes. I. *J. Phys. Chem.* 58, 725-732 (1954).
34. Haruki, F., Kirk, J.E.: Composition of acid mucopolysaccharides in human vascular tissue. *J. Lab. Clin. Med.* 64, 867-868 (1964).
35. Hascall, V.C., Heinegård, D.: Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 249, 4232-4241 (1974).
36. Haug, A., Smidsrød, O.: Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta Chem. Scand.* 24, 843-854 (1970).
37. Hill, D.K.: The organization of the inter-fibre space in the striated muscle of the toad, and the alignment of striations of neighbouring fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 179, 368-384 (1965).
38. Hodara, M.A., v. Figura, K., Filipovic, I., Buddecke, E.: Topochemical studies on the glycosaminoglycan and lipid metabolism in bovine arterial tissue. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 445-452 (1973).
39. Jones, A.W.: Altered ion transport in vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. Influences of aldosterone, norepinephrine, and angiotensin. *Circulat. Res.* 33, 563-572 (1973).
40. Jones, A.W., Karreman, G.: Ion exchange properties of the canine carotid artery. *Biophys. J.* 9, 884-909 (1969).

41. Joseph, N.R., Catchpole, H.R., Laskin, D.M., Engel, M.B.: Titration curves of colloidal surfaces. II. Connective tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **84**, 224-242 (1959).
42. Kamen, M.D.: Radioactive tracers in biology. New York: Academic Press 1951.
43. Katchalsky, A., Alexandrowicz, Z., Kedem, O.: Polyelectrolyte solutions. In: Chemical physics of ionic solutions, edited by Conway, B.E., Barradas, R.G., pp. 295-346. New York, London, Sydney: John Wiley & Sons 1966.
44. Klotz, I.M., Darnall, D.W., Langerman, N.R.: Quaternary structure of proteins. In: The proteins, vol. I, edited by Neurath, H., Hill, R.L., pp. 293-411. New York, San Francisco, London: Academic Press 1975.
45. Kohn, R., Larsen, B.: Preparation of water-soluble polyuronic acids and their calcium salts, and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerization. *Acta Chem. Scand.* **26**, 2455-2468 (1972).
46. Krebs, H.A.: The measurement of the turnover rate of steady state systems in living tissues. In: Radioisotope techniques, Vol. I: Medical and physiological applications, edited by Ministry of Supply, pp. 145-155. London: Her Majesty's Stationery Office 1953.
47. Kretsinger, R.H., Nelson, D.J.: Calcium in biological systems. *Coord. Chem. Rev.* **18**, 29-124 (1976).
48. Ling, G.N., Kromash, M.H.: The extracellular space of voluntary muscle tissues. *J. Gen. Physiol.* **50**, 677-694 (1967).
49. Ling, G.N., Ochsenfeld, M.M., Karreman, G.: Is the cell membrane a universal rate-limiting barrier to the movement of water between the living cell and its surrounding medium? *J. Gen. Physiol.* **50**, 1807-1820 (1967).
50. MacGregor, E.A., Bowness, J.M.: Interaction of proteoglycans and chondroitin sulfates with calcium or phosphate ions. *Can. J. Biochem.* **49**, 417-425 (1971).
51. Manning, G.S.: Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. I. Colligative properties. *J. Chem. Phys.* **51**, 924-933 (1969).
52. Manning, G.S.: Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. II. Self-diffusion of the small ions. *J. Chem. Phys.* **51**, 934-938 (1969).
53. Manning, G.S.: Limiting laws for equilibrium and transport properties of polyelectrolyte solutions. In: Charged and reactive polymers, vol. I: Polyelectrolytes, edited by Sélégny, E., Mandel, M., Strauss, U.P., pp. 9-37. Dordrecht, Boston: D. Reidel Publ. Comp. 1974.
54. Maroudas, A., Evans, H.: A study of ionic equilibria in cartilage. *Conn. Tissue Res.* **1**, 69-77 (1972).
55. Marquardt, D.L.: An algorithm for least squares estimates of non-linear parameters. *J. Siam* **11**, 431-441 (1963).
56. Mathews, M.B.: Trivalent cation binding of acid mucopolysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 288-295 (1960).

57. Mathews, M.B.: The interactions of proteoglycans and collagen-model systems. In: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, vol. 2: Glycosaminoglycans and proteoglycans, edited by Balazs, E.A., pp. 1155-1169. London, New York: Academic Press 1970.
58. Mathews, M.B.: Comparative biochemistry of chondroitin sulphate-proteins of cartilage and notochord. *Biochem. J.* 125, 37-46 (1971).
59. Mathews, M.B.: Connective tissue. In: Molecular biology, biochemistry and biophysics, vol. 19, edited by Kleinzeller, A., Springer, G.F., Wittmann, H.G., Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1975.
60. Mathews, M.B., Lozaityte, I.: Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage. I. Molecular weight and shape. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 158-174 (1958).
61. Morris, E.R., Rees, D.A., Thom, D.: Characterization of polysaccharide structure and interactions by circular dichroism: order-disorder transition in the calcium alginate system. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 245-246 (1973).
62. Muir, H.: The chemistry of mucopolysaccharides of arteries. In: Biological aspects of occlusive vascular disease, edited by Chalmers, D.G., Gresham, G.A., pp. 60-75. Cambridge: At the University Press 1964.
63. Muir, H., Hardingham, T.E.: Structure of proteoglycans. In: Biochemistry of carbohydrates, vol. 5, MTP Int. Rev. Sci., edited by Whelan, W.J., pp. 153-222. London, Baltimore: Butterworths and University Park Press 1975.
64. Nagasawa, M.: Ion-binding phenomena of polyelectrolytes. In: Charged and reactive polymers, vol. 1: Polyelectrolytes, edited by S  legny, E., Mandel, M., Strauss, U.P., pp. 57-77. Dordrecht, Boston: D. Reidel Publ. Comp. 1974.
65. Nakamura, M., Yabuta, N.: Difference in acid mucopolysaccharides contents among aortas, carotid and cerebral arteries. *J. Atheroscler. Res.* 7, 83-87 (1967).
66.   brink, B.: A study of the interactions between monomeric tropocollagen and glycosaminoglycans. *Eur. J. Biochem.* 33, 387-400 (1973).
67.   brink, B.: Polysaccharide-collagen interactions. In: Structure of fibrous biopolymers, edited by Atkins, E.D.T., Keller, A., pp. 81-92. London: Butterworths 1975.
68.   brink, B., Sundel  f, L.-O.: Light scattering in the study of associating macromolecules. The binding of glycosaminoglycans to collagen. *Eur. J. Biochem.* 37, 226-232 (1973).
69. Pease, D.C., Bouteille, M.: The tridimensional ultrastructure of native collagenous fibrils, cytochemical evidence for a carbohydrate matrix. *J. Ultrastruct. Res.* 35, 339-358 (1971).
70. Perry, S.V., Grand, R.J.A.: Mechanisms of contraction and the specialized protein components of smooth muscle. *Br. Med. Bull.* 26, 219-226 (1979).
71. Preston, B.N., Snowden, J. McK., Houghton, K.T.: Model connective tissue systems: The effect of proteoglycans on the distribution of small non-electrolytes and micro-ions. *Biopolymers* 11, 1645-1659 (1972).

72. Raker, J.W., Taylor, I.M., Weller, J.M., Hastings, A.B.: Rate of potassium exchange of the human erythrocyte. *J. Gen. Physiol.* **33**, 691-702 (1950).
73. Rees, D.A.: Shapely polysaccharides. *Biochem. J.* **126**, 257-273 (1972).
74. Rees, D.A.: Stereochemistry and binding behaviour of carbohydrate chains. In: *Biochemistry of carbohydrates*, vol. 5, MTP Int. Rev. Sci., edited by Whelan, W.J., pp. 1-42. London, Baltimore: Butterworths and University Park Press 1975.
75. Rees, P.M.: Electron microscopical observations on the architecture of the carotid arterial walls, with special reference to the sinus portion. *J. Anat.* **103**, 35-47 (1968).
76. Rice, S.A., Harris, F.E.: A chain model for polyelectrolytes. II. *J. Phys. Chem.* **58**, 733-739 (1954).
77. Rice, S.A., Nagasawa, M.: *Polyelectrolyte solutions*. London, New York: Academic Press 1961.
78. Robertson, J.S.: Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems. *Physiol. Rev.* **37**, 133-154 (1957).
79. Roedel, H., Siegel, G.: A practical method for determination of a poly-phase system (in Vorbereitung).
80. Roveri, N., Ripamonti, A., Garbisa, S., Volpin, D.: Structural organization of collagen fibrils in media aortic wall. *Conn. Tissue Res.* **5**, 249-253 (1978).
81. Sacks, J.: *Isotopic tracers in biochemistry and physiology*. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company 1953.
82. Scatchard, G., Coleman, J.S., Shen, A.L.: Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 12-20 (1957).
83. Schorah, C.J., Lovell, D., Curran, R.C.: Arterial acid mucopolysaccharide concentrations: their correlation with age and intimal hyperplasia. *Brit. J. Exp. Path.* **49**, 574-585 (1968).
84. Sheppard, C.W., Householder, A.S.: The mathematical basis of the interpretation of tracer experiments in closed steady-state systems. *J. Appl. Phys.* **22**, 510-520 (1951).
85. Siegel, G., Ehehalt, R., Gustavsson, H., Fransson, L.-Å.: Ion binding properties of vascular connective tissue. In: *Excitation-contraction coupling in smooth muscle*, edited by Casteels, R., Godfraind, T., Rüegg, J.C., pp. 279-288. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press 1977.
86. Siegel, G., Gustavsson, H., Ehehalt, R., Lindman, B.: The role of membrane potential in the regulation of vascular tone. In: *Recent advances in basic microcirculatory research*, edited by Lewis, D.H., *Bibl. anat.* **15**, pp. 126-135. Basel, München, Paris, London, New York, Sydney: S. Karger 1977.
87. Siegel, G., Roedel, H., Bertsche, O., Neumann, B.: Combination of morphometric and membrane physiological methods in vascular smooth muscle. In: *Quantitative analysis of microstructures in medicine, biology and materials development*, edited by Exner, H.E., pp. 153-167. Stuttgart: Dr. Riederer-Verlag 1975.

88. Siegel, G., Walter, A., Rettig, W., Kämpe, Ch., Ebeling, B.J., Bertsche, O.: Sodium compartments in the arterial wall. In: Intracellular electrolytes and arterial hypertension, edited by Zunkley, H., Losse, H., pp. 30-50. Stuttgart, New York: G. Thieme Verlag 1980.
89. Sirek, O.V., Schiller, S., Dorfman, A.: Acid mucopolysaccharides in aortic tissue of the dog. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 148-151 (1964).
90. Siri, W.E.: Isotopic tracers and nuclear radiations. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company 1949.
91. Smidsrød, O., Haug, A.: Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates. *Acta Chem. Scand.* 26, 2063-2074 (1972).
92. Smith, J.W.: Molecular pattern in native collagen. *Nature* 219, 157-158 (1968).
93. Solomon, A.K.: Equations for tracer experiments. *J. Clin. Invest.* 28, 1297-1307 (1949).
94. Solomon, A.K.: The kinetics of biological processes. Special problems connected with the use of tracers. In: Advances in biological and medical physics, edited by Lawrence, J.H., Tobias, C.A., vol. III, pp. 65-97. New York: Academic Press 1953.
95. Solomon, A.K.: Compartmental methods of kinetic analysis. In: Mineral metabolism, vol. I, Principles, processes, and systems, Part A, edited by Comar, C.L., Bronner, F., pp. 119-167. New York, London: Academic Press 1960.
96. Strauss, U.P.: Short-range interactions between polyions and small ions. In: Charged and reactive polymers, vol. I: Polyelectrolytes, edited by Sélégny, E., Mandel, M., Strauss, U.P., pp. 79-85. Dordrecht, Boston: D. Reidel Publ. Comp. 1974.
97. Toole, B.P., Lowther, D.A.: Dermatan sulfate-protein: isolation from and interaction with collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* 128, 567-578 (1968).
98. Van Wazer, J.R., Campanella, D.A.: Structure and properties of the condensed phosphates. IV. Complex ion formation in polyphosphate solutions. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 655-663 (1950).
99. Wells, J.D.: Thermodynamics of polyelectrolyte solutions. An empirical extension of the Manning theory to finite salt concentrations. *Biopolymers* 12, 223-227 (1973).
100. Westfall, T.C.: Local regulation of adrenergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 57, 659-728 (1977).
101. Zidek, W., Lange-Asschenfeldt, H.: Continuous measurements of extracellular ion activities in rat carotid artery by liquid ion exchanger micro-electrodes. In: Intracellular electrolytes and arterial hypertension, edited by Zunkley, H., Losse, H., pp. 19-23. Stuttgart, New York: G. Thieme Verlag 1980.

Tabelle 1. Wasser- und Ionengehalt des isolierten adventitiellen Bindegewebes der A. carotis des Hundes nach 3-14 h Äquilibrierung in drei verschiedenen  $K^+$ -Lösungen bei pH 7,0 ( $s_m \pm SEM$ ).

| $[K^+]_{\text{Bad}}$<br>[mMol/l] | H <sub>2</sub> O-Gehalt<br>[%] | K <sub>geb</sub>         | Na <sub>geb</sub>        | Mg <sub>geb</sub><br>[mMol/kg Fasern] | Ca <sub>geb</sub>       | Cl <sub>geb</sub>       |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,469                            | 61,8 $\pm$ 0,9<br>(n=10)       | 7,1 $\pm$ 1,0<br>(n=10)  | 17,6 $\pm$ 1,6<br>(n=10) | 1,3 $\pm$ 0,1<br>(n=10)               | 7,8 $\pm$ 0,7<br>(n=10) | 7,1 $\pm$ 1,3<br>(n=10) |
| 4,69                             | 62,3 $\pm$ 0,5<br>(n=16)       | 13,7 $\pm$ 1,3<br>(n=16) | 14,6 $\pm$ 3,9<br>(n=10) | 1,0 $\pm$ 0,1<br>(n=11)               | 7,0 $\pm$ 0,9<br>(n=11) | 9,4 $\pm$ 1,4<br>(n=11) |
| 46,9                             | 63,4 $\pm$ 0,9<br>(n=11)       | 37,1 $\pm$ 10,6<br>(n=5) | 8,8 $\pm$ 1,5<br>(n=9)   | 0,7 $\pm$ 0,04<br>(n=9)               | 6,9 $\pm$ 0,7<br>(n=10) | 17,0 $\pm$ 9,9<br>(n=4) |

Tabelle 2. Kaliumgehalt des adventitiellen Bindegewebes der A. carotis des Hundes nach verschiedenen Änästhesierungszeiten in KCl- und Krebslösung bei pH 7,0. Die  $K^+$ -Konzentration betrug jeweils 4,69 mMol/l. Die Kaliumgehalte aus Bestimmungen mit der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) sowie der Tracertechnik ( $^{42}K^+$ -Influx) wurden miteinander verglichen ( $\bar{x} \pm SD$ ).

| Lösung | Inkubationszeit<br>[h] | K-Gehalt (AAS)           |                              | K-Gehalt ( $^{42}K^+$ -Influx) |                              | Austauschfraktion |                 |
|--------|------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------|
|        |                        | total<br>[mMol/kg FG]    | gebunden<br>[mMol/kg Fasern] | total<br>[mMol/kg FG]          | gebunden<br>[mMol/kg Fasern] | total             | gebunden<br>[%] |
| KCl    | 3-14                   | $8,1 \pm 0,5$<br>(n=16)  | $13,7 \pm 1,3$               | $5,3 \pm 0,6$<br>(n=10)        | $6,5 \pm 1,5$                | 65,6              | 47,2            |
|        | 62-86                  |                          |                              | $5,5 \pm 0,4$<br>(n=10)        | $6,8 \pm 1,0$                |                   |                 |
|        | 110-158                | $4,8 \pm 0,3$<br>(n=5)   | $6,8 \pm 1,1$                | $5,3 \pm 0,4$<br>(n=15)        | $7,1 \pm 1,2$                | 111,3             | 104,0           |
| Krebs  | 3-14                   | $10,3 \pm 0,5$<br>(n=36) | $20,6 \pm 1,7$               | $5,4 \pm 0,5$<br>(n=10)        | $6,7 \pm 1,3$                | 52,2              | 32,5            |
|        | 62-86                  |                          |                              | $11,3 \pm 1,5$<br>(n=10)       | $23,0 \pm 4,0$               |                   |                 |
|        | 110-158                | $7,3 \pm 0,7$<br>(n=5)   | $15,8 \pm 2,1$               | $7,4 \pm 0,8$<br>(n=15)        | $12,6 \pm 2,0$               | 102,3             | 80,3            |

Tabelle 3. Parameter der  $^{42}K^+$ -Effluxkinetik am isolierten adventitiellen Bindegewebe der A. carotis des Hundes nach Äquilibrierung in  $K^+$ -Lösungen dreier Konzentrationsstufen. Amplituden und Ratenkonstanten wurden unter Verwendung von Gl. 1, Kompartimente und kinetische Koeffizienten mit Hilfe von Gl. 2 berechnet ( $s_m \pm SEM$  von fünf Versuchen).

| $[K^+]_{\text{Bad}}$<br>[mMol/l] | Amplitude $A_i$<br>[mMol/kg FG]                                                                                   | Ratenkonstante $b_i$<br>[s <sup>-1</sup> ]                                                                  | Kompartiment $S_i$<br>[mMol/kg FG]               | Kinetischer Koeffizient $k_i$<br>[s <sup>-1</sup> ]                     | Austauschfraktion<br>[%] |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 0,469                            | $A_1 = 0,138 \pm 0,028$<br>$A_2 = 0,198 \pm 0,077$<br>$A_3 = 0,054 \pm 0,027$<br>$\Sigma A_i = 0,390 \pm 0,086$   | $b_1 = 2,619' - 2 \pm 0,564' - 2$<br>$b_2 = 4,219' - 3 \pm 0,767' - 3$<br>$b_3 = 4,619' - 4 \pm 0,632' - 4$ | $S_1 = 0,202$<br>$S_2 = 0,134$<br>$S_3 = 0,054$  | $k_{10} = 2,207' - 2$<br>$k_{21} = 5,008' - 3$<br>$k_{31} = 4,619' - 4$ | 12,8                     |
| 4,69                             | $A_1 = 0,765 \pm 0,268$<br>$A_2 = 1,220 \pm 0,213$<br>$A_3 = 0,167 \pm 0,057$<br>$\Sigma A_i = 2,152 \pm 0,347$   | $b_1 = 2,292' - 2 \pm 0,424' - 2$<br>$b_2 = 4,136' - 3 \pm 0,707' - 3$<br>$b_3 = 4,620' - 4 \pm 0,632' - 4$ | $S_1 = 1,206$<br>$S_2 = 0,779$<br>$S_3 = 0,167$  | $k_{10} = 1,872' - 2$<br>$k_{21} = 5,062' - 3$<br>$k_{31} = 4,620' - 4$ | 25,7                     |
| 46,9                             | $A_1 = 8,982 \pm 0,981$<br>$A_2 = 13,599 \pm 1,268$<br>$A_3 = 0,265 \pm 0,038$<br>$\Sigma A_i = 22,846 \pm 1,604$ | $b_1 = 2,000' - 2 \pm 0,267' - 2$<br>$b_2 = 4,369' - 3 \pm 0,650' - 3$<br>$b_3 = 3,660' - 4 \pm 0,632' - 4$ | $S_1 = 14,834$<br>$S_2 = 7,747$<br>$S_3 = 0,265$ | $k_{10} = 1,612' - 2$<br>$k_{21} = 5,423' - 3$<br>$k_{31} = 3,660' - 4$ | 58,9                     |

Tabelle 4. Parameter der  $K^+$ -Erkennung an einer dünnen Schicht adventitiellen Bindegewebes der A. carotis des Hundes nach Applikation in  $K^+$ -Lösungen zweier Konzentrationsstufen. Die Daten wurden nach Gl. 3 und 4 für bulk Diffusion und Gleichzeitigkeit der chemischen Reaktion der  $K^+$ -Ionen gewonnen ( $s_m \pm$  SEM von fünf Versuchen).

| $[K^+]_{\text{Bad}}$<br>[mMol/l] | $\Sigma S_i$<br>[mMol/kg FG] | $S_1$<br>[mMol/kg FG] | $R$<br>[1]        | $\mu$<br>[s <sup>-1</sup> ] | $\mu a^2/D$<br>[1] | $D$<br>[10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ] | $R^k$<br>[1]      | $\mu^k$<br>[s <sup>-1</sup> ] |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 0,469                            | 0,40 $\pm$ 0,06              | 0,22 $\pm$ 0,03       | 0,630 $\pm$ 0,181 | 5,008 <sup>-3</sup>         | 0,693 $\pm$ 0,090  | 1,168 $\pm$ 0,142                                          | 0,365 $\pm$ 0,228 | 4,619 <sup>-4</sup>           |
| 4,69                             | 2,29 $\pm$ 0,35              | 1,41 $\pm$ 0,37       | 0,857 $\pm$ 0,382 | 5,062 <sup>-3</sup>         | 0,944 $\pm$ 0,177  | 0,985 $\pm$ 0,130                                          | 0,156 $\pm$ 0,047 | 4,620 <sup>-4</sup>           |
| 46,9                             | 25,36 $\pm$ 1,11             | 17,30 $\pm$ 1,07      | 0,470 $\pm$ 0,080 | 5,423 <sup>-3</sup>         | 1,010 $\pm$ 0,095  | 0,900 $\pm$ 0,119                                          | 0,015 $\pm$ 0,002 | 3,660 <sup>-4</sup>           |

Halbe Schichtdicke  $a = 0,04$  cm;  $R = C_2/C_1$ ;  $R^k = C_2/C_1$ ;  $\mu = k_{-1}$ ;  $\mu^k = k_{-1}$ ;  $D$  Diffusionskoeffizient für  $K^+$  im Gewebe

Tabelle 5. Affinitätskonstanten  $K_A$  für die  $K^+$ -Bindung und Konzentration der am " $K^+$ -Austausch teilnehmenden Sites  $S_2$  und  $S_3$  des adventitiellen Bindegewebes der A. carotis des Hundes.

| Site  | $[K^+]_{Bad}$<br>[mMol/l] | [SK]<br>[meq/kg Fasern] | $[S']^*$ | $n_x/n_{46,9}$<br>[%]   | $K_A$<br>[l/Mol] | $\log K_A$ |
|-------|---------------------------|-------------------------|----------|-------------------------|------------------|------------|
| $S_2$ | 0,469                     | 0,334                   | 2,847    | 2-15(14 <sup>±</sup> )  | ≥ 250            | ≥ 2,4      |
|       | 4,69                      | 1,973                   | 1,683    | 10-17(16 <sup>±</sup> ) |                  |            |
|       | 46,9                      | 21,184                  | 1,806    | 100                     |                  |            |
| $S_3$ | 0,469                     | 0,133                   | 0,284    | 20-60(59 <sup>±</sup> ) | ≥ 1000           | ≥ 3,0      |
|       | 4,69                      | 0,424                   | 0,090    | 60-75(71 <sup>±</sup> ) |                  |            |
|       | 46,9                      | 0,723                   | 0,015    | 100                     |                  |            |

\*) Werte, berechnet mit  $K_A = 260$  (1000) l/Mol für  $S_2$  ( $S_3$ ).  $n_x/n_{46,9}$  Anzahl an austauschbaren Sites, auf  $S_2$  in Relation zu  $n$  bei  $[K^+]_{Bad} = 46,9$  mMol/l.

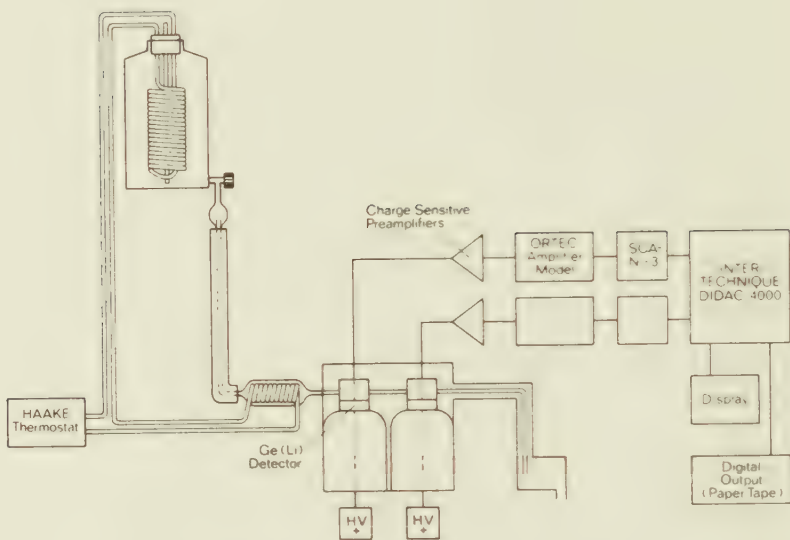


Abb. 1. Schema des Versuchsaufbaus für die simultane Messung des  $^{42}\text{K}^+$ -Effluxes eines Präparates nach der direkten und indirekten Methode.

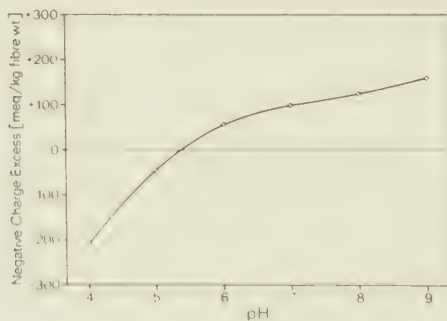


Abb. 3. Titrationskurve von isoliertem, adventitiellem Bindegewebe der A. carotis des Hundes in modifizierter Krebs-Lösung. Der Nettoüberschuß fixer Ladungen wurde aus dem Gehalt an mobilen Ionen berechnet.

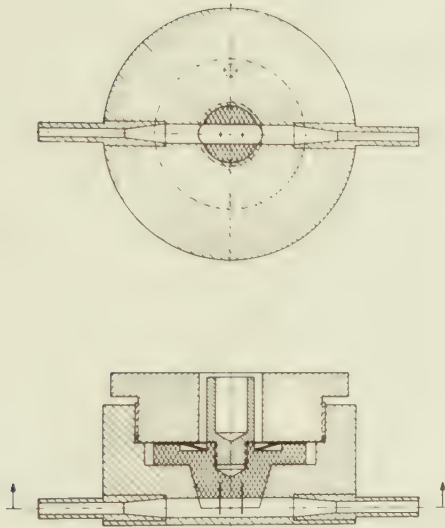


Abb. 2. Spülkammer zur kontinuierlichen Aktivitätsmessung im Präparat bei den  $^{42}\text{K}^+$ -Effluxversuchen (direkte Methode).

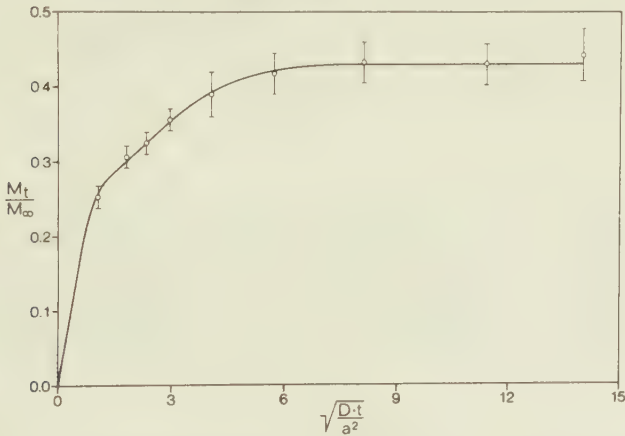


Abb. 4. Stationäre  $^{42}\text{K}^+$ -Influskinetik am isolierten, adventitiellen Bindegewebe der A. carotis des Hundes in modifizierter Krebs-Lösung bei pH 7,3 [ $s_m \pm \text{SEM}$  (5)].  $M_\infty$  entspricht dem  $\text{K}^+$ -Gesamtgehalt nach 3-14 h Äquilibrierungszeit (AAS),  $M_t/M_\infty$  der ausgetauschten Fraktion zur Zeit t. Die ausgezogene Kurve stellt die Kinetik für bulk diffusion und reversible Bindung von Kalium an eine Site nach Gl. 3 und 4 mit den Parametern  $a = 0,025 \text{ cm}$ ;  $D = 1,14 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ;  $R = 0,63$ ;  $\mu = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  dar. Die Austauschfraktion beträgt 0,43, das schnell austauschende Kompartiment des Gewebswassers wurde aus  $[\text{K}^+]_{\text{Bad}}$  und Wassergehalt berechnet.

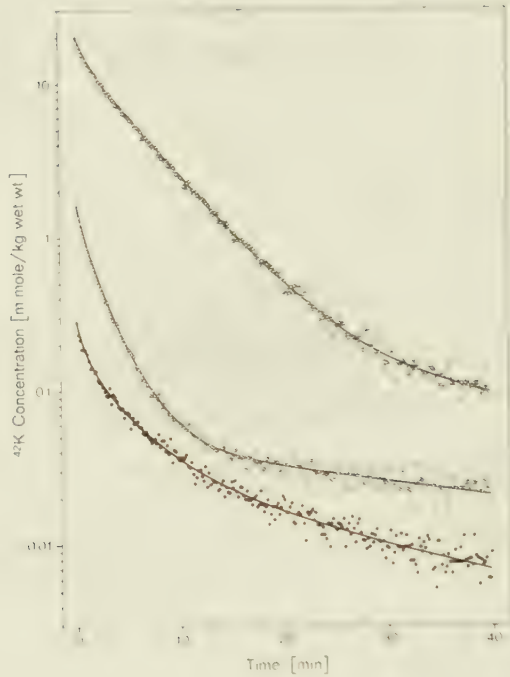


Abb. 5. Stationäre  $^{42}\text{K}$ -Konzentration im isolierten, identifizierten Fingergewebe der A. carotis des Hundes in  $\text{K}^+$ -Lösungen der Konzentrationsstufen 0,469 (•), 4,69 (○) und 46,9 mmol/l (Δ) bei pH 7,0. Die Darstellung zeigt die Abnahme der radioaktiven  $\text{K}^+$ -Konzentration im Präparat in Intervallen von 10 s von drei Einzelversuchen. Die stark ausgezogenen Linien entsprechen den durch Computeranpassung gefundenen, optimalen dreifach-exponentiellen Funktionen nach einem 3-Kompartimentmodell.

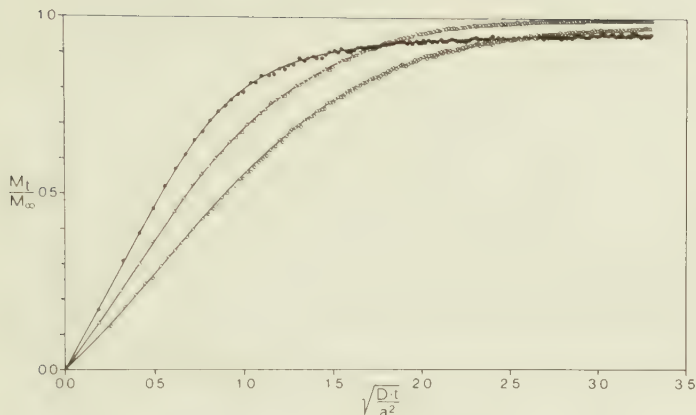


Abb. 6. Influxprofilanalyse [vgl. 4a] der stationären  $^{42}\text{K}^+$ -Austauschkinetik am isolierten, adventitiellen Bindegewebe der A. carotis des Hundes in  $\text{K}^+$ -Lösungen der Konzentrationsstufen 0,469 ( $\bullet$ ), 4,69 ( $\circ$ ) und 46,9 mMol/l ( $\Delta$ ) bei pH 7,0. Dargestellt sind drei Einzelversuche, die aus den  $^{42}\text{K}^+$ -Effluxmessungen berechnet wurden. Die ausgezogenen Kurven entsprechen einer Kinetik für bulk diffusion und reversible Reaktion mit zwei Sites nach Gl. 3 und 4 mit folgenden Parametern:  $[\text{K}^+]_{\text{Bad}} = 0,469 \text{ mM}$ :  $R = 0,146$ ,  $\mu = 6,5417 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $a^2/D = 143 \text{ s}$ ,  $R^* = 0,083$ ,  $\mu^* = 2,4064 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $[\text{K}^+]_{\text{Bad}} = 4,69 \text{ mM}$ :  $R = 0,999$ ,  $\mu = 4,2098 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $a^2/D = 225 \text{ s}$ ,  $R^* = 0,248$ ,  $\mu^* = 6,1157 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $[\text{K}^+]_{\text{Bad}} = 46,9 \text{ mM}$ :  $R = 0,591$ ,  $\mu = 5,8844 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $a^2/D = 148 \text{ s}$ ,  $R^* = 0,013$ ,  $\mu^* = 2,4948 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .



Mein herzlicher Dank und Verehrung gilt Herrn Professor Dr. *G. Siegel*, der die Arbeit umsichtig und mit großzügiger Unterstützung begleitet und in sehr persönlicher Weise die Verknüpfung von fachlicher Begeisterung und disziplinierter Arbeit vermittelt hat.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. *A. Walter* und Herrn *Ch. Kämpfe* für Anregungen und Diskussionen sowie Frau *Ch. Fuhrmann* für geduldige und lebenswürdige Zusammenarbeit im Labor.

Die Arbeit wurde von der Studienstiftung des deutschen Volkes mit einem Promotionsstipendium unterstützt.



## LEBENS LAUF

Wolfgang Rettig, geboren am 14.1.1955 in Much. Schulbesuch 1961 bis 1973 in Much und Bensberg. Abitur 1973 am Otto-Hahn-Gymnasium Bensberg.

Medizinstudium ab 1973 in Berlin bis zum Staatsexamen im Oktober 1979. Ein-jähriger Studienaufenthalt an der Queen's University Belfast, Irland, 1976-77.

Approbation als Arzt 16. November 1979.

Seit 1974 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes. 1979-80 Promotionsstipendium der Studienstiftung, danach Assistenzarzt im Krankenhaus Moabit, Berlin, in der I. Abteilung für Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie und Pulmonologie (Prof. Dr. K.-P. Schüren).

Ab April 1981 Mitarbeiter am Memorial Sloan-Kettering Institute for Cancer Research, New York, U.S.A. (Dr. L.J. Old, Dr. H.F. Oettgen).





